

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-276578

⑬ Int. Cl.³

C 12 N 15/56
9/44

識別記号

ZNA

庁内整理番号

7823-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)11月13日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

⑮ 発明の名称 ネオブラナーゼ遺伝子、それを含有する組換えベクター並びにネオブラナーゼ

⑯ 特 願 平1-77345

⑰ 出 願 平1(1989)3月29日

⑱ 発 明 者 岡 田 茂 孝 奈良県生駒市東生駒3丁目207-269

⑲ 発 明 者 今 中 忠 行 大阪府吹田市山田西3-33 A-205

⑳ 発 明 者 栗 木 隆 大阪府吹田市五月ガ丘東8番 A-403

㉑ 出 願 人 食品産業酵素機能変換 東京都中央区日本橋小伝馬町17番17号 峰澤金物ビル4階
技術研究組合

明 細 書

式1;

1. 発明の名称

ネオブラナーゼ遺伝子、それを含有する組換えベクター並びにネオブラナーゼ

2. 特許請求の範囲

1) 下記の式1で表される塩基配列またはそれと実質的に同等な塩基配列を有するネオブラナーゼ遺伝子。

2) 下記の式1で表されるネオブラナーゼ遺伝子またはそれと実質的に同等な遺伝子を含有する組換えベクター。

3) 下記の式2で表されるアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するネオブラナーゼ。

```

ATGAGCAAG 10 20 30 40 50
AGCCATCTA CCACCCCGG GCTGACACT TCGCTATGC
60 70 80 90 100
CTATCATAGT GAGACACTTC ATCTTGGCT TCGACAAATA AAGACATTA
110 120 130 140 150
TCGATCGTGT TGAAGCTGTG CATGGTGACC CGTATGACTG GCAGATGGA
160 170 180 190 200
GCTTGGCAGT TTCAAATGAT GCCGATCGGA AAGACAGGAA GTGACAGCTT
210 220 230 240 250
GTTGATTTAT TCGTTCCCGC AAGTCAGACC TCCGTAATCGG CGGTACGCT
260 270 280 290 300
ACGGGTTGCT GCTGTATTCA GCGAGAGGAA AGCTCGTTTA TACAGMAAA
310 320 330 340 350
GGGTTTACT TTGAGGTTCC AACGATGAT ACGGCTTACT ACTTTGCTT
360 370 380 390 400
TCCCTTCTT CATCCAGTCG ACTTGTTCGA GCGCCCGGAT TCGGTAAAGC
410 420 430 440 450
ATACAGCTGT GTATCAAAAT TTCCCTGACC GGTTCGCCAA CCGCAGCCCA
460 470 480 490 500
TCAATCAGTC CAGAGGATTC GCGCCCGTGG GCGAGCCAGC ATCCAGCACG

```

510 520 530 540 550
 AACCAATTIT TTGCGCGG ACTTGAAGG GATTATCGAT CATCTCGATT
 560 570 580 590 600
 ACCTTCTGA CCITCGTATT ACCGGTATT ACTTAACGCC GATCTTCGGT
 610 620 630 640 650
 TCTCCGTCAA ACCATAAATA CGATACCGCT GATTATTTTG AAGTCGATCC
 660 670 680 690 700
 ACACITTTGGG GATAAAGAAA CGTTGAAGAC CCTCATCGAC GGTTCGCATG
 710 720 730 740 750
 AAAAAAGTAT CCGCGTTATG CTCGATGCGG TGTTTAACCA TTGCGGCTAT
 760 770 780 790 800
 GAGTTCCGCC CGTTCCAAGA TGTATGGAAG AATGGTGAGT CCTCAAAATA
 810 820 830 840 850
 TAAGGACTGG TTTCACATTC ATGAATTTCC CTTGCAAAACA GAGCCCGCGC
 860 870 880 890 900
 CGAATTACGA TACATTTTCCA TTGCTGCCAC AATGCCAAA GCTGAACACC
 910 920 930 940 950
 GCCAATCCAG AAGTGAAGCG TTAATTGCTT GATTTTCCGA CATATTGGAT
 960 970 980 990 1000
 TCGTGAGTTT GACATTGACG GTTGGCGGCT TGATGTTGCC AATGAATTCG

1010 1020 1030 1040 1050
 ACCACGAATT TTGCGCGGAG TTCCGCCAGG AGGTAAAGGC ACTGAAGCCG
 1060 1070 1080 1090 1100
 GAGGTATACA TCCTCGGGGA AATTGGGAT GATCGGATGC CGTGCCTGCG
 1110 1120 1130 1140 1150
 CGGTGACCAG TTTGACCGAG TCATGAACCTA CCGCTTTACA GACGGGGTGC
 1160 1170 1180 1190 1200
 TCGCGTTTTT CGCCAAAGGAA GAGATTAGTG CACGCCAGTT TGCTAATCAA
 1210 1220 1230 1240 1250
 ATGATGCGATG TACTTCTATC GTATCCGAAC AATGTCGAACG AGGCCCGCATT
 1260 1270 1280 1290 1300
 CAATTTGCTC GGCAGTCATG ATACATCAAG AATTCCTACC GTTTGCGCGG
 1310 1320 1330 1340 1350
 CGCATATCCG CAAGGTGAAG TTGTTATTTT TGTTCAACT GACCTTCACG
 1360 1370 1380 1390 1400
 GGTTCACCAT GCATTTACTA TCGGGATGAA ATCGGCATGA CCGGGCGGAA
 1410 1420 1430 1440 1450
 CGATCCCGAG TCCCGGAAGT GCATGCTGTG GGATCCGATG CAACAAACA
 1460 1470 1480 1490 1500
 AAGAGCTGCA CCAACACGTC AAGCAGCTGA TAGCGCTGCG CAACACGAT

1510 1520 1530 1540 1550
 CGGTCACTAC GCCCGCGGGA AATCTCTTTT CTTCATGCCG ATGATGAAT
 1560 1570 1580 1590 1600
 GAACTATCTT ATTTACAAA AATCAGATCG AGATGAACG GTGTTAGTCA
 1610 1620 1630 1640 1650
 TCATCAATCG GAGCGACCA AAGCCGACA TCCCGATCCC GCTCATGCA
 1660 1670 1680 1690 1700
 AGAGCAACAT GGCTCGTTAA CCTCTTGACT GGGGACGGT TTGCAGCCGA
 1710 1720 1730 1740 1750
 GCCAGAACG CTTTGCACCT CTTACCGCC CTATGGGTTT GTACTTTATG
 1760
 CAATAGAACCA TTGGTAG

MetLeuGlyGluValIleIleThrHisArgIleValAspAsnPheValIleValIleAspSer
 10
 GluThrLeuIleIleValArgThrIleValAspValIleAspArgValGluLeuLeu
 30
 HisGlyAsnProTyrAsnTrpGlnAsnIleValTrpIlePheGlnMetPheMetArg
 50
 LysThrGlySerAspGluLeuPheAspTyrTrpPheAlaGluValysProTyrArg
 70
 ArgLeuArgTyrGlyPheValLeuTyrSerGlyGluIleValysLeuValTyrThrGluLys
 90
 GlyPheTyrPheGluValProThrAspAspThrAlaTyrTyrPheGlySerPheProPheLeu
 110
 HisArgValAspLeuPheGluValAspProValysAspThrValTrpTrpGlnIle
 130
 PheProGluValArgPheAlaValAsnGlyAsnProSerIleSerProGluIleValSerArgProTrp
 150
 GlySerGluAspProThrProThrSerPheGlyGlyAspLeuGluIleValIleAsp
 170
 HisLeuAspTyrLeuLeuIleValLeuIleThrIleValTyrLeuThrProIlePheArg
 190
 200

210 220
 SerProSerAsnHisLysTyrAspThrAlaAspTyrTheGluValAsnProHisSheGly
 230 240
 AsplyGluThrLeuLysThrLeuIleAspArgCysHisGluLysGlyIleArgValMet
 250 260
 LeuAspAlaValPheAsnHisCysGlyTyrGluPheAlaProPheGlnAspValTrpLys
 270 280
 AsnGlyGluSerSerLysTyrLysAspTrpPheHisIleHisGluPheProLeuGlnThr
 290 300
 GluProArgProAsnTyrAspThrPheArgPheValProGlnMetProLysLeuAsnThr
 310 320
 AlaAsnProGluValLysArgTyrLeuLeuAspValAlaThrTyrTrpIleArgGluPhe
 330 340
 AspIleAspGlyTrpArgLeuAspValAlaAsnGluIleAspHisGluPheTrpArgGlu
 350 360
 PheArgGlnGluValLysAlaLeuLysProAspValTyrIleLeuGlyGluIleTrpHis
 370 380
 AspAlaMetProTrpLeuArgGlyAspGlnPheAspAlaValMetAsnTyrPropheThr
 390 400
 AspGlyValLeuArgPheAlaGlyGluGluIleSerAlaArgGlnPheAlaAsnGln
 410 420
 MetMetHisValLeuHisSerTyrProAsnAsnValAsnGluAlaAlaPheAsnLeuLeu
 430 440
 GlySerHisAspThrSerArgIleLeuThrValCysGlyGlyAspIleArgLysValLys
 450 460
 LeuLeuPheLeuPheGlnLeuThrPheThrGlySerProCysIleTyrTyrGlyAspGlu
 470 480
 IleGlyMetThrGlyGlyAsnAspProGluCysArgLysCysMetValTrpAspPromet
 490 500
 GlnGlnAsnLysGluLeuHisGlnHisValLysGlnLeuIleAlaLeuArgLysGlnTyr
 510 520
 ArgSerLeuArgArgGlyGluIleSerPheLeuHisAlaAspAspGluMetAsnTyrLeu
 530 540
 IleTyrLysLysThrAspGlyAspGluThrValLeuValIleIleAsnArgSerAspGln
 550 560
 LysAlaAspIleProIleProLeuAspAlaArgGlyThrTrpLeuValAsnLeuLeuThr
 570 580
 GlyGluArgPheAlaAlaGluAlaGluThrLeuCysThrSerLeuProProTyrGlyPhe
 ValLeuTyrAlaIleGluHisTrp

3. 発明の詳細な説明

1) 産業上の利用分野

本発明は、ネオブルラナーゼ遺伝子、それを含む有する組換えベクター並びにネオブルラナーゼに關し、その産業上への利用を計るものである。

2) 従来技術とその課題

ネオブルラナーゼは本発明者等によって発見され命名された新酵素であり、ブルランを加水分解し、主生成物としてパノースを生じるブルラナーゼ類似酵素である（特願昭62-330624号、又は *Journal of Bacteriology* 第1554頁（1988年））。

パノースは抗腐蝕性を示し、かつビフィズス菌の増殖因子であるなど有用な性質であるが、ネオブルラナーゼはブルランから高収率でこのパノースを生成するところから、本発明者等によってその応用研究が進められている。

またネオブルラナーゼの遺伝子を組込んだプラスミドにより形質転換された枯草菌も既に本発明者等により発明されているが（特願昭62-330625号）、当該酵素についての詳細な知見がないため、ネ

オブルラナーゼを大量に生産させるべき遺伝子工学的手段を講じることや蛋白質工学的手法による当該酵素自身の改良を行うことが困難であった。

3) 課題解決の手段

本発明者等は、これらの課題を解決すべく、バチルス ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) IRS40株（微工研研受託 PERM P-98 09）由来のネオブルラナーゼ遺伝子を含む2154塩基対のDNA断片の全塩基配列を決定し、ネオブルラナーゼ遺伝子の構造を明らかにすると共に、ネオブルラナーゼ蛋白の構造（アミノ酸配列）を明らかにし、本発明を完成するに至った。以下に、本発明の具体的な手段を実施例により説明する。

4) 実施例

A) ネオブルラナーゼ遺伝子の取得

ネオブルラナーゼ遺伝子の材料としては、本発明者等による pPP10（特願昭62-330625号、又は *Journal of Bacteriology*, 第170巻、第1554頁（1988））を用いた。本プラスミドには、前述の *Bacillus stearothermophilus* IRS40株由来のネ

オブラナーゼ遺伝子が組込まれており、その作成方法については上記明細書又は特許文において述べたのと同様な手段によった。

B) DNA塩基配列の決定

プラスミド pPP10 を各種制限酵素を用いて分解し、プラスミド pUC118/119 に組込んだ後、ヘルパーファージ M13KO7 により一本鎖 DNA を調製し、dideoxy 法で塩基配列を決定した (第 1 図)。決定された塩基配列は 2154 塩基対よりなり、ネオブルラナーゼ遺伝子 (apIT) の全領域を含んでいる。第 1 図の塩基配列中には、110 番目の ATG から始まり 1874 番目の TAG で終わる 1764 塩基対のネオブルラナーゼに対応するオープンリーディングフレームが存在する。

ATC開始コドンの7塩基前にAAGGAGGAGAのリボソームバイディングサイトが存在する。プロモーター領域の-35、-10については、20番目にTTGACと43番目にTACTCTあるいは25番目にTTTTTと48番目にTTTAAATが見出される。また、オープンリーディングフレームに対応するペプチドのC末端から39塩基下流には転写におけるターミネーターとして機能

しうる逆方向反復配列がみとめられる。

C) アミノ酸配列 (式 II) 及びアミノ酸組成

決定されたネオブランダナーゼ遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列からネオブランダナーゼは588のアミノ酸残基からなる分子量69,144ダルトンの酵素であると考えられた。実際に精製したネオブランダナーゼを用いてN末端アミノ酸配列を分析した結果、Met-Arg-Lys-Glu^u-Alaの配列となっており、塩基配列から推定されるアミノ酸配列と完全に一致した。

5) 発明の効果

本発明によりネオプルラナーゼを適当な宿主で大腸生産することや蛋白質工学的的手法により酵素を改良することなどの手段が講じられることとなった。

4. 図面の簡単な説明

圖 1 圖——地基配列圖

刊紙
第1回 の 1

第1回々々

[illegible]

AGCGTAAAGCATACAGTCTGTATCAAAATTTTCCCTGACACCGCTTCCGCAAC	510	520	530	540	550
GGCAACCCCATCAATCAAGTGAAGCAAGATCCGCGCGCTGGCGCAACGACGACGA	560	570	580	590	600
TCGACACCAACCAAGTTTCTTTTGGCGCGGACTTGCAGAGGCAATTATCATCTC	610	620	630	640	650
ATCTGCATTTACCTGTTTGACCTCTGGTAATTACCGGTAATTACTAGACCGCGG	660	670	680	690	700
ATCTTCGCTTCTCCGTCACAAACATATATACGATACCCGCTGATATTTTGA	710	720	730	740	750
AGTCGATTCGACACTTGGGATATAGAAAGACGTTGAAACCGCTATCGACCC	760	770	780	790	800
TTGCGCATGAAAGATATCCCGCTTATGCTGCATATCCGCTTTTAAACAT	810	820	830	840	850
TTGCGCATGAAAGATATCCCGCTTATGCGAAGATATGGAAGATGCTGATCTCTG	860	870	880	890	900
CTCAAAATATTAGAGATGGTTTTCACATTCATGAAATTTTCCGTCGCAACGAG	910	920	930	940	950
AGCGTAAAGCATACAGTCTGTATCAAAATTTTCCCTGACACCGCTTCCGCAAC	960	970	980	990	1000

特開平2-276578(6)

5. 補正の対象
図面

6. 補正の内容
別紙のとおりに図面を補正する

7. 添付書類の目録
図面の第1図の1から第1図の5まで

各1通